

GENE ASSOCIE A LA VIRULENCE DU PARASITE LEISHMANIA

L'invention se situe dans le domaine de la lutte contre les leishmanioses. Elle résulte de la mise en évidence, à partir d'isolats sauvages de *Leishmania major*, d'un gène codant pour une protéine, désignée LmPDI, présentant deux régions identiques à la séquence (Cys-Gly-His-Cys) du site actif potentiel des protéines disulfides isomérases (PDI). Cette protéine LmPDI est exprimée de façon prédominante dans les isolats les plus virulents du parasite. Elle constitue d'une part, une nouvelle cible thérapeutique pour élaborer des médicaments anti-leishmaniose et, d'autre part, un élément nouveau pouvant entrer dans la composition de préparations immunogènes et éventuellement vaccinales, destinées à protéger un hôte, humain ou animal, contre *Leishmania*.

Les leishmanioses constituent un groupe hétérogène de pathologies qui affectent plusieurs millions d'individus et sont dues à l'infection de l'hôte par un parasite protozoaire du genre *Leishmania*. L'expression clinique de l'infection est caractérisée par un grand polymorphisme, incluant l'infection asymptomatique, les formes cutanées simples ou récidivantes, les formes cutanées diffuses ou anergiques, les formes cutanéomuqueuses et les formes viscérales, mortelles en l'absence de traitement spécifique. En général, et selon la distribution géographique de la maladie, chaque espèce ou sous-espèce de *Leishmania* est responsable d'une forme clinique particulière; cependant, cette règle n'est pas stricte. De plus, dans un même foyer, une même espèce parasitaire peut être responsable de formes cliniques de sévérité variable. Cette diversité dans l'expression clinique de l'infection est due, au moins en partie, à une diversité dans la virulence du parasite.

Durant son cycle, le parasite alterne entre deux stades: le stade promastigote flagellé, qui se trouve dans le tube digestif de l'insecte

vecteur, et le stade amastigote dans le macrophage de l'hôte. Les drogues anti-leishmaniennes sont difficiles à utiliser, entre autre à cause de leur toxicité et des résistances de plus en plus fréquentes développées par le parasite (Lira, Sundar et al. 1999). Par ailleurs, les vaccins récemment développés et testés n'ont pas montré, pour le moment, l'efficacité attendue (Sharifi, FeKri et al. 1998; Khalil, El Hassan et al. 2000).

L'absence d'outils pour le contrôle des leishmanioses est expliquée en partie par la complexité des cycles de transmission du parasite et par l'insuffisance des connaissances actuelles sur la biologie du parasite. Durant les dix dernières années, plusieurs molécules ayant un rôle fondamental dans la biologie et l'infectivité du parasite ont été identifiées. Des modifications des glyco-conjugués de surface, particulièrement le lipophospho-glycane (LPG), sont associées à des modifications dans l'infectivité et la virulence du parasite *Leishmania (L.) major* et *L. donovani* (Beverley and Turco 1998; Desjardins and Descoteaux 1998; Sacks, Modi et al. 2000; Spath, Epstein et al. 2000), ce qui ne semble pas être le cas pour *L. mexicana* (Ilg 2000; Ilg, Demar et al. 2001). Des molécules impliquées dans la biosynthèse du LPG : phosphomannose isomérase (Garami and Ilg 2001), LPG1 (Sacks, Modi et al. 2000; Spath, Epstein et al. 2000), LPG2 (Descoteaux, Luo et al. 1995) et galactosyl transférase (De and Roy 1999) ont été aussi associées à la virulence de *Leishmania*. D'autres facteurs de virulence ont été récemment décrits. Ils comprennent la famille des cystéine protéinases (Mottram, Brooks et al. 1998), les *mitogen-activated protein* (MAP)-kinases (Wiese 1998), le gène A2 (Zhang and Matlashewski 1997), la glycoprotéine de surface gp63 (Chakrabarty, Mukherjee et al. 1996), la *kinetoplastid membrane protein* (KMP)-11 (Mukhopadhyay, Sen et al. 1998), la superoxyde dismutase (Paramchuk, Ismail et al. 1997), la trypanothione reductase (Dumas, Ouellette et al. 1997), et certains membres des protéines du choc thermique (HSP) (Hubel, Krobitsch et al. 1997).

La caractérisation des facteurs de virulence peut avoir des implications fondamentales pour le développement de nouveaux médicaments ou vaccins contre ces affections. En effet, le ciblage préférentiel d'une protéine impliquée dans la virulence du parasite permet d'éviter l'apparition inutile de résistances chez des souches peu dangereuses, résistances qui peuvent ensuite être transmises à d'autres souches. De plus, une mutation de la protéine de virulence ciblée, entraînant une résistance au médicament, peut dans ce cas entraîner aussi une diminution, voire une perte de la virulence du parasite, et donc un certain effet thérapeutique.

Durant les dernières décennies, plusieurs approches ont été utilisées pour aborder l'étude des facteurs de virulence du parasite *Leishmania*. Ces approches sont fondées sur des études génétiques, comme la complémentation de parasites mutés (Ryan, Garraway et al. 1993; Descoteaux, Luo et al. 1995; Desjardins and Descoteaux 1997; Wiese 1998), l'utilisation de la technique de l'inactivation de gène (Titus, Gueiros-Filho et al. 1995; Mottram, Souza et al. 1996; Dumas, Ouellette et al. 1997; Hubel, Krobitsch et al. 1997; Mottram, Brooks et al. 1998), ou l'analyse de gènes de résistance aux médicaments sur des parasites manipulés au laboratoire (Cotrim, Garrity et al. 1999; Perez-Victoria, Perez-Victoria et al. 2001). Ces études ont permis l'identification de plusieurs gènes importants pour la biologie du parasite, qui sont actuellement en cours de validation comme cibles de nouvelles drogues (Selzer, Chen et al. 1997; McKerrow, Engel et al. 1999), ou pour le développement et l'utilisation de mutants atténués comme vaccins vivants (Titus, Gueiros-Filho et al. 1995; Streit, Recker et al. 2001). Il est important de signaler que la quasi-totalité des études effectuées jusqu'à présent sur la virulence du parasite *Leishmania* sont basées soit sur des clones de laboratoire qui ont perdu leur virulence après une culture prolongée, soit sur des parasites génétiquement manipulés par des expériences de mutagenèse, d'inactivation ou d' surexpression de gènes. Il est donc possible que les conclusions relatives

aux gènes de virulence identifiés dans ces conditions ne soient pas réellement pertinentes en ce qui concerne la pathogénicité naturelle du parasite dans les foyers de transmission.

Dans le but d'étudier les bases moléculaires de la virulence du parasite, en évitant le biais méthodologique lié à l'utilisation de souches de laboratoire, les inventeurs ont dans un premier temps isolé des souches sauvages de *Leishmania (L.) major* présentant des niveaux différents de virulence. *L. major* est l'agent de la leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ), qui sévit chez l'homme de façon épidémique sur une aire très large qui s'étend sans discontinuité de la Mauritanie jusqu'en Mongolie. Les inventeurs ont identifié des isolats de *L. major*, obtenus de lésions humaines de LCZ, tous obtenus durant la même saison de transmission, et qui diffèrent dans leur pathogénicité dans le modèle expérimental de l'infection des souris sensibles BALB/c (exemple 1). Les différences dans le pouvoir pathogène expérimental corrélerent avec des différences de croissance *in vitro*, ce qui reflète des variations dans la biologie de ces isolats sauvages.

La technique de "Differential Display" (Liang and Pardee 1992; Liang, Bauer et al. 1995) a ensuite été utilisée pour identifier des gènes différentiellement exprimés entre des isolats complètement différents dans leur pouvoir pathogène expérimental chez la souris BALB/c (deux isolats très virulents et deux autres peu virulents). Cette technique permet l'étude de gènes qui s'expriment à des niveaux différents sans connaître, au préalable, leur séquence. Trois transcrits préférentiellement exprimés dans les deux isolats les plus virulents ont ainsi été identifiés. L'un de ces transcrits a été entièrement caractérisé grâce au criblage d'une banque d'ADNc de *L. major*. L'analyse de la séquence a montré une homologie avec la famille des protéines disulfide isomérases (PDI, Erp60 et Erp72) des eucaryotes. Cette nouvelle protéine a été désignée LmPDI pour les raisons suivantes : tout comme les autres membres de la famille des PDI, (i) LmPDI possède deux domaines actifs CGHC, (ii) la région N-terminale

de cette protéine contient une séquence signal potentielle et, dans la région carboxy-terminale, un signal potentiel pour la rétention dans le reticulum endoplasmique (EEDL), (iii) elle peut s'organiser sous forme de structure oligomérique, (iv) la protéine recombinante produite dans *E. coli* exprime une activité PDI *in vitro*. Par ailleurs, en dehors des régions conservées sus-mentionnées, il y a très peu de similitudes entre LmPDI et les autres PDI déjà décrites. En fait, la famille des PDI comprend plusieurs molécules très divergentes impliquées dans les processus de maturation des protéines sécrétées dans le reticulum endoplasmique (Noiva 1999; Frand, Cuozzo et al. 2000). Les PDI sont des protéines multi-fonctionnelles qui interviennent dans les mécanismes complexes de rétention, réparation, régulation de l'expression, elles assistent les changements de conformation pour ne permettre la sortie du reticulum endoplasmique que des protéines correctement repliées. En plus de leurs fonctions enzymatiques (réduction et isomérisation), d'autres fonctions ont été récemment attribuées aux PDI ; elles incluent les activités chaperonnes, la fixation aux peptides et l'adhésion cellulaire (Ferrari and Soling 1999). Il est intéressant de souligner que LmPDI est exprimée de façon prédominante dans les isolats les plus virulents (exemple 2). Au total, l'ensemble de ces résultats suggère que LmPDI joue un rôle important dans la virulence naturelle du parasite *Leishmania*, et peut donc constituer une nouvelle cible pour la chimiothérapie ou la vaccination.

De plus, des données récentes sur l'implication de l'équivalent bactérien des PDI (Martin 1995; Ostermeier, De Sutter et al. 1996) (appelé DsbA pour *disulfide bond*) suggèrent le rôle que cette protéine peut jouer dans la pathogénicité de différents microorganismes (Yu and Kroll 1999). L'inactivation du gène DsbA affecte de façon dramatique la survie et la virulence de *Shigella flexneri* (Yu 1998; Yu, Edwards-Jones et al. 2000). DsbA est par ailleurs impliquée dans la genèse de l'entérotoxine de *Vibrio cholerae* (Peek and Taylor 1992; Yu, Webb et al. 1992). DsbA est aussi

importante pour la pathogénicité des espèces de *Escherichia coli* pathogènes : chez les espèces pathogènes pour le tractus urinaire, elle catalyse la formation des ponts disulfures d'une protéine chaperonne spécifique du pili (Zhang and Donnenberg 1996). Chez les espèces entéro-pathogènes, elle est aussi requise pour la stabilité et la formation des pili (Hultgren, Abraham et al. 1993; Wang, Bjes et al. 2000).

La présente demande constitue la première description suggérant un rôle important des PDI comme facteur de virulence d'un parasite protozoaire. La LmPDI pourrait exercer ses effets en assistant les changements de conformation et la stabilité d'autres facteurs essentiels pour la biologie et la pathogénie du parasite *Leishmania*. L'identification de tels facteurs serait extrêmement intéressante pour une meilleure compréhension de la biologie de ce parasite, et pour la mise au point de nouveaux traitements ou vaccins contre les leishmanioses.

L'invention porte donc en premier lieu sur une protéine impliquée dans la virulence de *Leishmania*, comportant au moins un site (Cys-Gly-His-Cys) identique au site actif potentiel d'une protéine de la famille des protéines disulfides isomérases (PDI). Cette protéine est de préférence une protéine codée par le parasite lui-même.

En particulier, l'invention porte sur la protéine LmPDI de *Leishmania major*, de séquence SEQ ID No: 3, et sur tout variant fonctionnel de la LmPDI, présentant au moins 40% d'identité, et de préférence au moins 80%, avec la LmPDI.

On définira ici un « variant fonctionnel de la LmPDI » comme une protéine capable de compléter la LmPDI dans un test d'infectivité effectué avec une souche de *L. major* dans laquelle le gène de la LmPDI aurait été inactivé. On désigne ici, par test d'infectivité, tout test permettant d'évaluer des propriétés biologiques relatives à la croissance du parasite

classiquement associées à la virulence. En particulier, on peut citer les trois types de tests suivants :

- Cinétique de croissance en milieu liquide de la forme promastigote du parasite , par exemple par une technique du type de celle décrite au point 2 de l'exemple 5 ;
- Capacité d'infection des macrophages de souris cultivés en vitro, par une technique telle que celle décrite à l'exemple 6 et dans l'article de Kebaïer et al, 2001 ;
- Capacité d'induire la leishmaniose murine expérimentale par infection de souris sensibles (BALB/c par exemple). La technique est détaillée par exemple au point 3 de l'exemple 5, et dans l'article de Kebaïer et al, 2001.

Les pourcentages d'identité avec la LmPDI seront évalués en utilisant le logiciel CLUSTAL W version 1.8 (Thompson, J.D., Higgins, D.G. et Gibson, T.J.), ou le logiciel BOXSHADE version 3.21 (Hoffman, K. et Baron, M.), qui ont donné des pourcentages d'identité de la LmPDI avec des protéines de la famille des PDI de plusieurs espèces entre 27 et 36 % (exemple 2).

Un deuxième mode de réalisation de l'invention concerne un polypeptide recombinant comportant au moins un fragment de plus de 10 acides aminés d'une protéine telle que celles définies ci-dessus, le cas échéant fusionné à un autre fragment polypeptidique, ledit polypeptide recombinant étant susceptible de déclencher une réaction immunologique contre un épitope de la LmPDI, lorsqu'il est administré à un animal. L'invention porte également sur un polypeptide recombinant comportant au moins un fragment de plus de 10 acides aminés d'une protéine telle que celles définies ci-dessus, le cas échéant fusionné à un autre fragment polypeptidique, ledit polypeptide recombinant étant susceptible d'être reconnu par des anticorps dirigés contre la protéine LmPDI.

Dans tout ce qui précède et suit, le terme « polypeptide » doit être compris au sens large, c'est-à-dire incluant des séquences d'au moins 10 acides aminés (ou davantage lorsque cela est précisé), comprenant ou non des motifs glycosylés ou des glycolipides, et quelle que soit sa structure, primaire, secondaire ou tertiaire. Le fragment de la LmPDI présent dans les polypeptides recombinants de l'invention décrits ci-dessus peut présenter une taille supérieure à 15, 20, 30, 50 ou 100 acides aminés, et même davantage.

La LmPDI, recombinante ou purifiée à partir de cellules infectées, ainsi qu'un polypeptide de l'invention, peuvent être utilisés pour immuniser un hôte, humain ou animal, afin de le protéger de la leishmaniose ou de produire et récupérer des anticorps dirigés contre la LmPDI, comme cela est décrit à l'exemple 2.

Un polypeptide recombinant particulier selon l'invention est la protéine LmPDI-(His)₆ de séquence SEQ ID No :4, décrite à l'exemple 2.

Un autre exemple de polypeptide recombinant selon l'invention est une protéine de fusion entre un fragment de la LmPDI, comportant au moins un épitope de la LmPDI, et un polypeptide porteur favorisant la présentation de ce fragment au système immunitaire. Il peut s'agir, notamment, d'une fusion de tout ou partie de la LmPDI avec un fragment de la β -lactamase, d'une anatoxine tétanique ou diphtérique, ou de tout autre polypeptide d'un organisme pathogène, notamment d'origine parasitaire, bactérienne ou virale.

Un autre aspect de l'invention concerne une séquence d'acide nucléique codant pour une protéine ou un polypeptide tels que ceux décrits ci-dessus. Une séquence d'acide nucléique préférée comprend la séquence codante de la LmPDI, de séquence SEQ ID No : 2, ou un fragment de cette séquence de taille supérieure ou égale à 30 nucléotides, de préférence supérieure à

100 nucléotides, codant pour un polypeptide comportant au moins un épitope caractéristique de la LmPDI.

5 L'invention porte aussi sur un vecteur d'acide nucléique comprenant une séquence d'acide nucléique de l'invention. Par exemple, il peut s'agir d'un plasmide, d'un cosmide, d'un phage, ou d'un virus. De façon préférée, un vecteur de l'invention permettra l'expression, dans une cellule hôte, d'une protéine ou d'un polypeptide selon l'invention. En particulier, un vecteur de l'invention peut permettre l'expression, dans une bactérie ou une cellule eucaryote, de la LmPDI.

10 L'invention porte aussi sur une cellule en culture comprenant un vecteur tel que ceux décrits ci-dessus. Cette cellule peut être une bactérie, une levure, une cellule d'insecte, une cellule de mammifère, ou tout autre type de cellule. Elle peut être utilisée soit pour exprimer et éventuellement produire une protéine ou un polypeptide selon l'invention, soit pour produire un
15 vecteur qui servira ensuite à exprimer une protéine ou un polypeptide selon l'invention dans un autre type cellulaire en culture, ou *in vivo*. A titre purement illustratif et non limitatif, on peut citer les cellules CHO, VERO, BHK21 et les cellules d'insectes, comme types cellulaires utilisables *in vitro* dans le cadre de la présente invention. De même, on peut citer le BCG et
20 *Salmonella typhimurium* comme cellules utilisables *in vivo*. Enfin, il est important de noter que l'administration à un individu, d'un vecteur viral, par exemple le virus de la vaccine, ou d'ADN, codant pour un polypeptide ou une protéine tels que décrits ci-dessus, à des fins vaccinales, entre également dans le cadre de la présente invention.

25 Une cellule particulière de l'invention est la souche bactérienne LmPDI-XL₁, déposée à la Collection Nationale de Culture des Microorganismes (CNCM) le 31/01/2001 sous le numéro I-2621. Cette souche est dérivée d'une bactérie XL1-Blue MRF' strain de génotype $\Delta(\text{mrcA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173\text{endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac[F' proAB lac}^{\text{q}}\text{Z } \Delta\text{M15}$

Tn10 (Tet^r)], transformée par le plasmide pBK-CMV-LmPDI. Ce plasmide correspond au plasmide pBK-CMV commercialisé par Stratagene (La Jolla, CA), dans lequel a été rajouté l'ADNc de la LmPDI, entre les sites de restriction *EcoR* I et *Xho* I.

5 L'invention porte également sur une sonde d'acide nucléique qui s'hybride spécifiquement, en conditions stringentes, avec la séquence nucléique de SEQ ID No : 2, permettant ainsi de déterminer la présence ou l'absence du gène de virulence codant pour la LmPDI, dans un échantillon biologique.

10 On définira ici des « conditions d'hybridation stringentes » comme des conditions qui permettent l'hybridation spécifique de deux molécules d'ADN à environ 65°C, par exemple dans une solution de 6X SSC, 0.5% SDS, 5X solution Denhardt's et 100 µg/ml of d'ADN non spécifique dénaturé, ou n'importe quelle solution de force ionique équivalente, et après une étape de lavage réalisée à 65°C, par exemple dans une solution d'au plus 0.2X
15 SSC et 0.1% SDS, ou n'importe quelle solution de force ionique équivalente. Toutefois, la stringence des conditions peut être adaptée par l'homme du métier, en fonction de la taille de la séquence à hybrider, son contenu en nucléotides GC, et de n'importe quel autre paramètre, par exemple suivant les protocoles qui sont décrits dans in Sambrook et al.,
20 2001 (Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 3rd Ed., laboratory press, Cold Spring Harbor, New York).

Dans la définition ci-dessus, et dans l'ensemble du présent texte, le terme « spécifique » est à comprendre au sens large du terme, habituellement
25 donné dans les laboratoires. Ainsi, une molécule A reconnaît spécifiquement une molécule B si, dans un mélange complexe, la molécule A a une affinité pour la molécule B significativement supérieure à son affinité pour les autres molécules du mélange, de telle façon qu'il soit possible de détecter la molécul B par l'intermédiaire de la molécule A.

Les conditions de stringence utilisées ici sont celles qui permettent de détecter les PDI des différentes espèces leishmaniennes et non celles de l'hôte et d'autres microorganismes en présence d'une sonde radiomarquée synthétisée à partir du cDNA de la LmPDI.

5 Par exemple, une sonde de l'invention, qui s'hybride spécifiquement avec la séquence SEQ ID No :2 en conditions stringentes, est telle qu'un *Southern blot* effectué en utilisant cette sonde marquée, présente, lorsqu'il est effectué sur un échantillon d'ADN de cellules infectées par une souche de *L. major* exprimant la LmPDI, au moins une bande nettement distincte, 10 et d'intensité supérieure aux autres bandes (non spécifiques), ladite bande n'apparaissant pas sur un *Southern blot* effectué dans les mêmes conditions, sur un échantillon d'ADN de cellules non infectées par une souche de *L. major*.

15 Un autre aspect de l'invention est une amorce nucléotidique permettant l'amplification spécifique d'au moins une partie de la séquence de SEQ ID No : 1, à partir de cellules infectées par *Leishmania*, permettant ainsi de déterminer la présence ou l'absence du gène de virulence codant la LmPDI, dans un échantillon biologique. L'amplification sera dite « spécifique » dès lors que la réaction d'amplification, réalisée à partir de 20 cellules contrôle non infectées par *Leishmania*, ne conduit à l'amplification significative d'aucune séquence, alors que la même réaction, réalisée sur un échantillon contenant la séquence nucléotidique de SEQ ID No :1, conduit à l'amplification d'au moins un fragment de cette séquence.

25 Les sondes et amorces mentionnées ci-dessus peuvent le cas échéant être marquées, et/ou présentées dans des trousse de diagnostic, qui font également partie de l'invention. En effet, il peut être avantageux de déterminer la présence et, éventuellement, le niveau d'expression du gène de la LmPDI lors d'une infection par *Leishmania*, par exemple pour

déterminer la charge parasitaire et/ou l'opportunité d'un traitement impliquant l'utilisation d'un inhibiteur de la LmPDI.

5 Dans un autre mode de réalisation, l'invention porte sur des anticorps purifiés, reconnaissant spécifiquement la LmPDI. Il peut s'agir d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux, humains, humanisés, ou animaux. Ces anticorps peuvent être purifiés, par exemple, sur une colonne d'affinité LmPDI, en utilisant le protocole décrit dans la partie expérimentale. De tels anticorps spécifiques de la LmPDI peuvent trouver plusieurs applications.

10 Ils peuvent servir à détecter la présence de la LmPDI dans un échantillon biologique, par exemple pour diagnostiquer une leishmaniose et/ou déterminer l'opportunité d'utiliser un inhibiteur de la LmPDI pour traiter cette leishmaniose.

15 L'invention concerne donc aussi une méthode de diagnostic *in vitro* d'une infection par un parasite responsable de la Leishmaniose. Une telle méthode peut être réalisée en utilisant un polypeptide ou une protéine de l'invention, ou un anticorps dirigé contre cette protéine, ou encore à l'aide de sondes telles que décrites ci-dessus.

Une méthode de diagnostic particulière de l'invention comprend les étapes suivantes :

- 20 - la mise en contact d'au moins un anticorps selon l'invention avec un prélèvement biologique d'un sujet partiellement infecté par un parasite responsable de la Leishmaniose, dans des conditions permettant la formation d'un complexe immun entre ledit anticorps et les protéines antigéniques contenues dans le prélèvement,
- 25 - la détection dudit complexe.

La détection du complexe peut se faire à l'aide de n'importe quel moyen connu de l'homme du métier (réaction enzymatique, transfert de fluorescence ou autre).

Les anticorps de l'invention peuvent être compris dans des trousse de diagnostic, au même titre que les sondes et les amorces mentionnées ci-dessus.

5 Des trousse de diagnostic pour la mise en œuvre de la méthode ci-dessus font partie intégrante de la présente invention.

A titre d'exemple, une telle trousse peut comprendre

- au moins un anticorps selon l'invention,
- un milieu approprié à la formation de complexe immun entre les protéines antigéniques contenues dans le
- 10 prélèvement analysé et ledit anticorps,
- des réactifs permettant la détection des complexes ainsi formés,
- le cas échéant, des échantillons témoins.

15 Alternativement, les anticorps de l'invention peuvent entrer dans la composition d'un médicament destiné à la prophylaxie, à l'atténuation, ou au traitement de certaines leishmanioses.

Dans un autre mode de réalisation de l'invention, l'invention porte sur une composition immunogène, comportant une protéine et/ou un polypeptide recombinant et/ou une séquence d'acide nucléique et/ou un vecteur et/ou

20 une cellule de l'invention tels que décrits précédemment, ladite composition immunogène étant capable de stimuler *in vitro* la prolifération de cellules mononucléées provenant d'individus ayant été en contact avec un parasite *Leishmania*. Une composition immunogène préférée de l'invention est capable de stimuler *in vitro* la prolifération de cellules mononucléées

25 provenant d'individus ayant été en contact avec *Leishmania major*.

Dans une réalisation préférée des compositions immunogènes de l'invention, ces compositions présentent une formulation

pharmaceutiquement acceptable pour être administrée à un hôte humain ou animal.

Les inventeurs ont montré que la LmPDI était susceptible d'induire *in vitro* la production de cytokines par des cellules mononucléées provenant d'individus ayant été en contact avec *L. major*, et que le profil d'expression des cytokines correspondait à celui observé lors d'une réponse immunitaire de type Th1 (exemple 3). Une composition immunogène telle que celles décrites ci-dessus, capable d'induire une réponse immunitaire de type Th1 lorsqu'elle est administrée à un hôte, humain ou animal, constitue donc une réalisation particulièrement préférée de l'invention.

L'invention porte également sur une composition vaccinnante comportant une protéine, et/ou un polypeptide recombinant, et/ou une séquence d'acide nucléique, et/ou un vecteur, et/ou une cellule de l'invention telle que décrite précédemment, ladite composition vaccinnante étant destinée à protéger un hôte, humain ou animal, contre la leishmaniose. De préférence, les compositions vaccinnantes de l'invention sont formulées de façon acceptable sur le plan pharmaceutique pour être administrées à un hôte humain ou animal.

Une telle composition vaccinnante peut se présenter sous forme de liquide à injecter au patient, par voie sous-cutanée ou intra-musculaire, ou sous forme de vaccin oral, sous forme de pommade, ou encore sous forme de particules liées à une séquence nucléotidique de l'invention, par exemple par adsorption d'ADN à la surface des particules. Cette dernière forme permet l'administration du vaccin par « bombardement » (ou « *gene gun* »). Il est important de noter que les formulations de compositions vaccinnantes mentionnées ici le sont uniquement à titre d'exemples, et ne sont en aucun cas restrictives.

Les compositions immunogènes et/ou vaccinnantes de l'invention peuvent aussi comporter un ou plusieurs antigène(s) hétérologue(s) vis-à-vis d

Leishmania, et/ou une ou plusieurs séquence(s) d'acide nucléique codant pour de tels antigènes. Les compositions de l'invention peuvent donc déclencher une réaction immunologique vis-à-vis de plusieurs pathogènes différents et, le cas échéant, constituer des polyvaccins.

5 Le processus de vaccination, ainsi que les doses d'agent actif, devront être adaptés au type de vaccin utilisé et au mammifère auquel il est administré.

Des procédés de vaccination contre *Leishmania*, consistant à administrer à un hôte, humain ou animal, une composition comportant une protéine, et/ou un polypeptide recombinant, et/ou une séquence d'acide nucléique, et/ou
10 un vecteur, et/ou une cellule de l'invention tels que ceux décrits plus haut, entrent également dans le cadre de la présente invention.

La mise en valeur du rôle de la LmPDI dans la virulence de *Leishmania* permet aussi d'envisager des nouvelles stratégies de recherche de molécules actives pour inhiber la croissance du parasite. En effet, il a été
15 montré, qu'une molécule inhibitrice de la PDI, par exemple telle que la bacitracine ou l'acide chloromercurilbenzenesulfonique (pCMBS) inhibe la croissance de *Leishmania* en milieu liquide (exemple 4). L'invention porte donc aussi sur un procédé de criblage de molécules susceptibles d'inhiber la croissance de *Leishmania major*, comportant une étape d'évaluation de
20 la capacité desdites molécules à inhiber l'activité de la LmPDI. Les Protéines Disulfides Isomérases présentent en général plusieurs activités telles que, notamment, des activités d'oxydo-réduction, d'isomérase, et de chaperonne. Les procédés de criblage selon l'invention peuvent porter sur l'inhibition de n'importe laquelle des fonctions de la LmPDI.

25 Dans un procédé de criblage particulier de l'invention, l'étape d'évaluation de la capacité d'une molécule à inhiber l'activité de la LmPDI est effectuée dans un test de réactivation de la RNase A réduite et dénaturée, comportant les étapes suivantes :

- incubation de la RNase A réduite et dénaturée en présence de LmPDI, dans des conditions permettant sa réactivation,
- incubation de la RNase A réduite et dénaturée dans des conditions identiques à celles permettant sa réactivation par la LmPDI, en ajoutant la molécule à tester,
- comparaison des résultats obtenus en absence et en présence de la molécule à tester, un défaut de réactivation de la RNase A en présence de la molécule testée révélant que cette molécule possède une activité inhibitrice de la LmPDI.

10 N'importe quel autre test d'activité des PDI peut être utilisé dans les procédés de criblage selon l'invention, en particulier n'importe quel test dérivé du protocole initial décrit par Lyles et Gilbert (1991).

15 Un procédé de criblage selon l'invention peut aussi comporter un test d'inhibition de la croissance de *Leishmania major* en milieu liquide et, le cas échéant, un test d'inhibition de la croissance de *Leishmania major* dans un modèle murin de leishmaniose expérimentale. Un exemple d'un tel procédé est détaillé dans la partie expérimentale, à l'exemple 5.

20 Les molécules actives criblées par le procédé tel que défini ci-dessus sont caractérisées par leur capacité à inhiber ou à moduler la croissance de *Leishmania major*.

25 Les résultats obtenus avec la bacitracine, et présentés dans l'exemple 4, montrent qu'un inhibiteur des PDI peut inhiber la croissance de *Leishmania*. L'utilisation d'un ou plusieurs inhibiteurs des Protéines Disulfides Isomérases (PDI), pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à la prophylaxie, à l'atténuation, ou au traitement d'une infection par *Leishmania*, fait donc aussi partie intégrante de l'invention. Parmi les composés possédant une activité anti-PDI et pouvant être utilisés suivant l'invention, on peut citer des anticorps anti-PDI ou anti-LmPDI, la bacitracine, la bacitracine de zinc, l'acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque)

(DTNB), l'acide p-chloromercuribenzenesulfonique (pCMBS), ou l'acide tocinoïque.

Les compositions préparées suivant les utilisations ci-dessus sont de préférence administrables à un hôte humain ou animal, par voie topique,
5 orale ou parentérale.

Selon un de ses aspects particuliers, l'invention porte sur l'utilisation de la bacitracine ou de la bacitracine de zinc comme inhibiteur de la croissance d'un parasite responsable de la leishmaniose ou comme agent actif contre une infection à *Leishmania*.

10 Bien entendu, une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une infection par *Leishmania*, contenant un ou plusieurs inhibiteurs des Protéines Disulfides Isomérases (PDI), fait partie intégrante de l'invention. Une telle composition peut notamment contenir de la bacitracine ou de la bacitracine de zinc. La composition peut notamment être formulée pour une
15 application topique, par exemple sous la forme d'une crème, d'un onguent, d'une pommade, ou d'un spray, sans que cela soit limitatif. Les inventeurs ont montré qu'une telle composition, appliquée localement sous forme de pommade au niveau du site d'injection du parasite chez des souris BALB/c, atténue la progression de la maladie (exemple 9 et figure 14).

20 La présente invention porte aussi sur une composition pharmaceutique destinée au traitement d'une infection par *Leishmania*, comportant au moins un anticorps spécifique de la LmPDI et/ou toute molécule qui inhibe l'activité PDI. Une telle composition est de préférence appropriée pour une administration topique, orale ou parentérale.

25 Des procédés de traitement des leishmanioses, comportant l'administration au patient, humain ou animal, d'un inhibiteur des PDI ou de la LmPDI, qu'il s'agisse d'un anticorps ou de tout autre type de molécule, entrent également dans le cadre de la présente invention.

Les exemples et figures ci-après, montrent les expériences biologiques qui ont été réalisées dans le cadre de cette invention et lui apportent le support expérimental requis, sans toutefois en limiter la portée. Ils illustrent aussi, de manière non restrictive, certains aspects de la mise en œuvre et de l'intérêt de la présente invention.

Légende des figures :

La figure 1 illustre l'analyse par "Differential Display" (DD) de l'expression de gènes de *Leishmania major* dans les deux isolats les plus virulents (94 et 67, V) et les deux isolats les moins virulents (32 et 07, v).

La figure 1A représente une portion d'un gel de séquençage après autoradiographie, montrant les produits amplifiés par PCR à l'aide d'un décamère arbitraire et d'une amorce oligo dT. Les ADNc différenciellement exprimés sont indiqués par des flèches. L'ADNc p14 est indiqué par un astérisque.

La figure 1B représente l'analyse par Northern blot de l'expression d'un gène identifié par la technique de DD entre les isolats les plus virulents (94 et 67, V) et les isolats les moins virulents (32 et 07, v). Les ARNm extraits à partir des promastigotes des différents isolats en phase stationnaire de croissance ont été hybridés avec la sonde radiomarquée p14. Après autoradiographie, les blots ont été déshybridés puis réhybridés avec une sonde spécifique du gène de l' α -tubuline de *L. major* (α -tub).

La figure 2 représente la séquence nucléotidique de l'ADNc (SEQ ID No : 1) de la LmPDI et sa séquence déduite en acides aminés (SEQ ID No : 3). Les nucléotides en minuscule représentent les régions non traduites. La séquence « leader » (SL) de 18 nt est soulignée et la séquence potentielle du signal de polyadénylation est encadrée. La séquence potentielle du

peptide signal est représentée par des lettres en gras. Les sites actifs potentiels de la LmPDI sont doublement soulignés et la séquence probable de rétention dans le réticulum endoplasmique est indiquée d'un trait discontinu.

5 La figure 3 montre l'alignement de la séquence en acide aminés de la LmPDI avec des protéines disulfide isomérases de *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*, GenBank accession no. : P12865), *Hypocrea jecorina* (*H. Jecorina*, 074568), *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*, 017908), *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*, 048949), *Drosophila melanogaster* (*D. melano*, P54399), *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*, Q27553), and *Homo sapiens* (*H. sapiens*, P072237). Les lettres encadrées en noir indiquent les acides aminés identiques et celles encadrées en gris indiquent les acides aminés similaires. Des «trous» ont été introduits pour obtenir le maximum de similarité entre les séquences alignées et sont indiqués par des tirets.

15 Deux logiciels ont été utilisés pour la réalisation des alignements :

- CLUSTAL W version 1.8

Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J.

20

- BOXSHADE version 3.21

Hoffman, K. and Baron, M.

25 La figure 4 illustre l'analyse du rôle de la LmPDI recombinante dans la réactivation de la RNase réduite et dénaturée. La RNase A réduite et dénaturée (8µM) a été incubée dans un tampon contenant 4.5mM (cCMP), 1mM Glutathione GSH, 0.2mM Glutathione disulfide GSSH, 2mM EDTA et 100mM Tris-HCl pH 8 en présence de Sérum albumine bovine (BSA) 30 (1.4µM) comme contrôle négatif, de Protéine Disulfide Isomérase bovine (1.4µM) comme contrôle positif, ou de LmPDI recombinante (1.4µM) pendant 30 minutes à 25°C. La réactivation de la RNase A est déterminée

par la mesure de l'activité RNase A à 296nm toutes les 5 minutes pendant 30minutes (Lyles and Gilbert 1991).

La figure 5A montre l'analyse par Southern blot du nombre de copies du gène de la LmPDI dans le génome de *Leishmania major*. 8µg de l'ADN génomique l'isolat 94 de *L. major* sont digérés par les enzymes de restriction suivantes : Aval, EcoRV, HindIII, PstI, EcoRI, XhoI, NcoI, SacI, SphI. Les enzymes marquées d'un astérisque coupent une seule fois à l'intérieur de l'ADNc de la LmPDI.

La figure 5B montre l'analyse par Southern blot du gène de la LmPDI dans différentes espèces de *Leishmania*. 8µg de l'ADN génomique de *L. major* (94), *L. infantum* dermatrope (*L. infantum* MC), *L. infantum* viscérotrope (*L. infantum* Visc) ; *L. donovani* sont digérés par l'enzyme Pst I. Les ADN génomiques sont hybridés dans ces expériences par la sonde représentant l'entière séquence de l'ADNc de la LmPDI.

La figure 6 montre l'immunodétection de la LmPDI native chez *L. major* avec différentes préparations d'anticorps anti-LmPDI. 20µg de protéines totales de promastigotes de GLC 94 dans du tampon de Laemmli (piste 1) ou en présence de 0.5mM de DTT (piste 2) et 0.05µg de LmPDI produite dans les bactéries *E. coli* et purifiée (rLmPDI) (piste 3) sont soumis à une électrophorèse puis transférés sur une membrane de nitrocellulose, puis révélés avec l'immunsérum anti-LmPDI (piste 1) ou les anticorps anti-LmPDI purifiés sur colonne d'affinité (pistes 2 et 3).

La figure 7 représente l'analyse par Western blot de l'expression de la LmPDI dans les deux isolats les plus virulents (94, 67, V) et les deux isolats les moins virulents (32, 7, v) de promastigotes. 20µg de protéines totales de promastigotes en phase stationnaire de croissance des différents isolats sont soumis à une électrophorèse puis transférés sur une membrane de nitrocellulose qui est incubée en présence de l'anticorps polyclonal anti-

LmPDI. Les flèches (>) indiquent les 3 protéines reconnues par l'immunsérum anti-LmPDI.

La figure 8 représente la prolifération des cellules mononucléées d'individus vivant dans un foyer de leishmaniose cutanée zoonotique en Tunisie, après incubation de LmPDI (5 µg/ml). Les cellules lympho-monocytaires sont récupérées, lavées par 3 centrifugations successives avec du milieu RPMI-PS/Glu (30 ml puis deux fois 10 ml) puis comptées et incubées à la concentration de 10^6 cellules/ml de milieu en présence ou en absence d'une concentration de 5 µg/ml de LmPDI. Après 5 jours de culture, la stimulation lymphocytaire est estimée par incorporation de thymidine tritiée. Le résultat est exprimé en CPM.

La figure 9 représente le résultat d'un test d'inhibition de la croissance des parasites (*L. major*) en milieu liquide, par la Bacitracine. Il s'agit des courbes de croissance sur 96 heures, de promastigotes de *L. major* en présence de 0, 1 mM, 1,5 mM, ou 2 mM de Bacitracine.

La figure 10 montre l'effet de la bacitracine (BAC), de la bacitracine de zinc (BACZn) du p-chloromercuribenzoic acid (pCMBA) et de l'acide tocinoic (TOC) sur l'activité *in-vitro* de la LmPDI recombinante. Différentes concentrations d'inhibiteurs (0 à 2mM) ont été utilisées pour suivre l'effet des inhibiteurs de PDI sur la capacité de la LmPDI à réactiver *in-vitro* la RNase A réduite et dénaturée. Comme contrôle positif (T) de ces expériences, la LmPDI sans inhibiteurs a été utilisée.

La figure 11 montre l'effet de la bacitracine (BAC) (figure 11A), de la bacitracine de zinc (BACZn) (figure 11B), du 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNMB) (figure 11C) et du p-chloromercuribenzoic acid (pCMBA) (figure 11D) sur la croissance *in-vitro* des leishmanies en milieu liquide. Différentes concentrations d'inhibiteurs (0 à 5mM) ont été utilisées pour suivre l'effet des inhibiteurs de PDI sur la multiplication des parasites *in-*

vitro. Comme contrôle de ces expériences, les parasites non traités avec les inhibiteurs (T-) ont été choisis.

La figure 12 montre l'inhibition de l'activité de la rLmPDI par la bacitracine et la bacitracine de zinc. L'effet de la bacitracine (BAC) et de la bacitracine de zinc (BACZn) sur l'activité de la rLmPDI a été mesuré *in vitro*. Différentes concentrations d'inhibiteurs de BAC et de BACZn (0 à 2mM) ont été testées pour analyser leur effet sur la capacité de la rLmPDI à réactiver *in vitro* la RNase réduite et dénaturée. L'activité de la rLmPDI en l'absence d'inhibiteurs sert de contrôle positif.

La figure 13 illustre l'inhibition de la multiplication de promastigotes GLC94 par la bacitracine de zinc. L'effet de la bacitracine de zinc (BACZn) sur la multiplication de promastigotes GLC94 a été déterminé *in vitro*. Différentes concentrations d'inhibiteur ont été testées pour analyser leur effet sur la capacité des parasites à se multiplier *in vitro*. Des parasites cultivés dans du milieu complet en l'absence d'inhibiteurs représentent le contrôle (C).

La figure 14 montre l'effet de la bacitracine de zinc sur l'évolution de la maladie chez des souris BALB/c sensibles infectées avec des promastigotes de l'isolat GLC94. Des souris BALB/c sensibles ont été infectées avec 10^6 promastigotes de l'isolat GLC94 dans le coussinet plantaire et traitées ou non avec de la bacitracine. Le traitement a été arrêté 9 semaines après infection (La flèche indique l'arrêt du traitement). Chaque courbe représente l'évolution de la taille d'une seule souris.

Exemples :

L'ensemble des résultats expérimentaux présentés dans les exemples suivants ont été obtenus avec les matériels et méthodes suivants :

5 Parasites et conditions de culture

Les isolats de *L. major* utilisés dans ce travail proviennent de lésions humaines de LCZ obtenus lors d'une étude résumée dans l'exemple 1. Les parasites ont été cultivés sur milieu NNN (milieu solide préparé à base d'agarose et de sang de lapin) à 26°C, et progressivement transférés dans
10 du RPMI (SIGMA, St Louis, MO) contenant 2mM de L-Glutamine, 100U/ml de pénicilline, 100µg/ml de streptomycine et 10% de Sérum de Veau Foetal inactivé (milieu complet). Les promastigotes en phase logarithmique de croissance sont ajustés à 10^6 parasites/ml dans un volume constant de milieu complet et incubés à 26°C. La phase stationnaire de croissance est
15 atteinte après 4 à 6 jours avec des densités de parasites allant de 3.10^7 à 8.10^7 . Ces promastigotes en phase stationnaire de croissance sont utilisés pour les extractions d'ARN et de protéines.

Extraction d'ARN et « Differential Display »

Les ARN totaux sont extraits à l'aide du réactif « TRIZOL » (Gibco-BRL). Les ARN polyA⁺ sont purifiés par passage sur colonne d'oligo dT /
20 cellulose à l'aide du kit « poly A⁺ ARN isolation kit » (Amersham-Pharmacia) selon les instructions du fabricant. 200ng d'ARNm ont été utilisés dans une réaction de reverse-transcription de 20µl contenant 1µM d'une amorce Oligo(dT)₁₁MN, avec M= A ou C ou G et N= A ou C ou G ou
25 T (Genset), 1X Tampon First Strand (Gibco-BRL), 5µM dNTP (Amersham-Pharmacia), 10U de RNAsin (Promega) et 200U de Reverse-Transcriptase (Gibco-BRL).

Après incubation à 37°C pendant 1 heure, la réaction est stoppée par une incubation de 5 minutes à 95°C. Les ADNc sont amplifiés par PCR à l'aide d'une combinaison de 12 oligo dT et de 10 décamères arbitraires. La PCR est effectuée dans un volume de 20µl contenant 2µl de la réaction de reverse-transcription, 0.2µM de l'amorce 5', 1µM de l'amorce 3', 2µM de dNTP, 10µCi [$\alpha^{35}\text{S}$]dATP, 1X tampon « Taq DNA polymerase reaction buffer » et 1U de Taq polymérase (Amersham-Pharmacia). Les réactions sont incubées dans un thermocycleur Perkin-Elmer 9600 pendant 40 cycles à 94°C pendant 30s, 40°C pendant 60s et 72°C pendant 30s suivis d'un cycle à 72°C pendant 6 minutes. Les produits de PCR sont analysés sur un gel de séquençage à 6% d'acrylamide. Le gel est séché sous vide sur un papier Whatman 3MM et autoradiographié. Les ADNc différentiellement exprimés sont excisés du gel, élués et réamplifiés par PCR en présence des mêmes oligonucléotides et dans les conditions décrites précédemment. Les produits d'amplification sont clonés dans le vecteur pMOSblue à l'aide du kit « blunt-ended PCR cloning kit » (Amersham-Pharmacia) selon les instructions du fabricant. Les fragments clonés sont séquencés grâce au kit « Sequencing Ready Reaction Kit » (Perkin-Elmer) et analysés à l'aide du séquenceur automatique ABI 377.

Analyse par Northern-Blot

200ng d'ARNm de promastigotes extraits durant la phase stationnaire de croissance des 4 isolats de *L. major* sont dénaturés, séparés sur un gel à 1,2% Agarose / 2,2 M formaldéhyde et transférés par capillarité sur une membrane « Hybond N⁺ » (Amersham-Pharmacia). Les acides nucléiques sont ensuite fixés par une cuisson de 2 heures à 80°C. Les fragments d'ADNc différentiellement exprimés et de l' α -tubuline sont marqués avec de l' [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP en utilisant le kit « megaprime DNA labelling system kit » (Amersham-Pharmacia). Les hybridations sont effectuées dans un

solution à 1X Denhardt's/6X SSC/ 0,1% SDS/ 0,1mg.ml⁻¹ d'ADN de sperme de saumon toute la nuit à 65°C. Les membranes sont lavées à 65°C dans une solution contenant 0,1X SSC/ 0,1% SDS et autoradiographiées.

5 Construction d'une banque d'ADNc et caractérisation de l'ADNc de la LmPDI

Une banque d'ADNc a été construite à partir de 5 µg d'ARNm de promastigotes de la souche la plus virulente (GLC94) dans le vecteur ZAPII, selon les instructions du fabricant (Stratagene). 6 .10⁶ plages de lyse ont été criblées à l'aide de la sonde p14 marquée au [α^{32} P]P]dCTP en utilisant le kit « megaprime DNA labelling system kit » (Amersham-Pharmacia). Les plages de lyse d'intérêt sont prélevées et criblées de nouveau pour isoler les clones positifs des clones contaminants. Les clones positifs sont ensuite séquencés.

Analyse par Southern-Blot

15 10µg d'ADN génomique extraits à partir de promastigotes de la souche la plus virulence GLC94 ont été digérés avec les enzymes de restriction indiquées dans la figure 5, et analysés sur un gel d'agarose 0,6%, puis transférés sur une membrane hybond N⁺ (Amersham-Pharmacia). La membrane est incubée en présence d'une sonde radioactive marquée au [α^{32} P] dCTP et correspondant au clone entier de l'ADNc de la LmPDI. Les membranes sont ensuite lavées dans une solution contenant 0,1X SSC/0,1%SDS et autoradiographiées.

20 Expression et purification de la protéine recombinante LmPDI dans les bactéries *E. coli* BL21

25 La séquence correspondant au cadre de lecture ouvert de l'ADNc de la LmPDI (1371pb) d'pourvu de la séquence codant pour le peptide signal a été cloné dans le vecteur d'expression bactérien pET-22b (Novagen). Les

bactéries *E. coli* BL21 contenant le plasmide recombinant (pET-22b-LmPDI) sont cultivées dans du milieu LB puis la synthèse de la protéine recombinante est induite en présence de 1mM d'isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG) pendant 4 heures. La protéine recombinante LmPDI-(His)₆ (SEQ ID No : 4) est purifiée par chromatographie d'affinité sur une colonne de nickel (Ni²⁺) (Amersham-Pharmacia). La pureté de la protéine produite est vérifiée par SDS-PAGE.

Production d'un anticorps polyclonal anti-LmPDI et analyse de l'expression de la protéine native par immunoblot.

Un lapin a été immunisé par une injection intramusculaire de 500 μ g de la LmPDI recombinante purifiée émulsifiée (v/v) dans de l'adjuvant de Freund incomplet (IFA, Sigma). Le lapin a reçu deux injections additionnelles de 500 μ g de protéine recombinante, la première par voie intramusculaire 15 jours après la première injection et la deuxième par voie intradermique 30 jours plus tard. Le lapin a été saigné 10 jours après la dernière injection, les sérums ont été récoltés et gardés à -80°C. Les lysats protéiques de promastigotes ont été dénaturés dans du tampon de Laemmli 1X pendant 10 minutes à 100°C, déposés sur un gel à 12% SDS-Acrylamide et électrotransférés sur une membrane de nitrocellulose (Millipore). Les membranes ont été incubées dans une solution de saturation PBS/0,1% Tween20 / 3% Lait écrémé à température ambiante pendant une heure puis dans la même solution contenant l'anticorps anti-LmPDI dilué au 1/1000^{ème} à 4°C pendant la nuit. Après 3 lavages dans du PBS/0,1% Tween20, les membranes ont été incubées en présence de l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase (Amersham-Pharmacia, dilué au 1/1000) pendant une heure à température ambiante et lavées 3 fois dans du PBS/0,1% Tween20. Les complexes protéines-anticorps ont été révélés par la détection de l'activité peroxydas en

utilisant le kit « ECL system » selon les instructions du fabricant (Amersham-Pharmacia).

Préparation de la RNase A réduite et dénaturée

20mg de Ribonucléase (RNase A) purifiée ont été réduits et dénaturés à température ambiante pendant 18 heures dans un tampon contenant 0,15 M de DTT, 6 M de guanidine-HCl et 0,1 M de Tris-HCl à pH 8,6 avant d'être purifiés sur une colonne de sephadex G-25 équilibrée dans du 0,01 M HCl. La concentration des fractions de RNase A réduite et dénaturée a été déterminée à l'aide du coefficient d'extinction de $9200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ à 275 nm. Les fractions sont conservées à -80°C pendant deux semaines.

Réactivation de la RNase A en présence de la protéine recombinante LmPDI

La RNase A réduite et dénaturée ($8 \mu\text{M}$) a été incubée dans un tampon contenant 4,5 mM (cCMP), 1 mM Glutathione GSH, 0,2 mM Glutathione disulfide GSSH, 2 mM EDTA et 100 mM Tris-HCl pH 8 en présence de Sérum albumine bovine (BSA) ($1,4 \mu\text{M}$) comme contrôle négatif, de Protéine Disulfide Isomérase bovine ($1,4 \mu\text{M}$) comme contrôle positif, ou de LmPDI recombinante ($1,4 \mu\text{M}$) pendant 30 minutes à 25°C . La réactivation de la RNase A a été déterminée par la mesure de l'activité RNase A à 296nm toutes les 5 minutes comme précédemment décrit dans la littérature (Lyles and Gilbert 1991).

Exemple 1 : sélection d'isolats de *L. major*, présentant différents niveaux de virulence

Les isolats d *L. major* utilisés dans ce travail proviennent de lésions humaines de LCZ obtenus lors d'une étude prospective menée en 1994-

1995 à El Guettar, au sud de la Tunisie (Louzir, Melby et al. 1998). Ils ont été choisis parmi 19 isolats sur la base de leur pouvoir pathogène lors de l'infection expérimentale de souris sensibles BALB/c : 2.10^6 amastigotes des divers isolats ont été injectés dans les coussinets des pattes arrières des souris BALB/c, et la progression de la lésion a été observée toutes les semaines pendant 9 semaines. Cinq semaines après l'infection, la production d'IL-4 et d'IFN- γ par des cellules mononucléées de ganglions lymphatiques activés *in vitro* par des antigènes du parasite a été mesurée.

Ces expériences ont montré d'une part, une grande hétérogénéité dans la progression de la maladie induite par les différents isolats de *L. major* et, d'autre part, que l'utilisation d'un même isolat conduit à des résultats reproductibles.

Les souches les plus virulentes ont induit les plus haut taux d'IL-4 et les plus bas taux d'IFN- γ *in vitro*, 5 semaines après l'infection.

A partir de l'observation que l'expression clinique de l'infection par *L. major* est variable suivant les souches et reproductible avec chacune d'entre elles dans le modèle expérimental de l'infection des souris sensibles BALB/c, les inventeurs ont émis l'hypothèse que les gènes impliqués dans la virulence seraient différenciellement exprimés entre les isolats les plus virulents par rapport aux isolats les moins virulents. Une analyse préliminaire de l'expression d'un groupe de gènes préalablement décrits, par d'autres auteurs, et associés à la virulence du parasite, comprenant LPG1, LPG2, KMP-11, Cpc, Cpb, Hsp100, Gene B et gp63, a été réalisée par une technique de transcription inverse et d'amplification génique quantitative. Cette analyse n'a pas montré de différence entre les isolats de *L. major* exprimant une pathogénicité différente chez les souris BALB/c (Kebaier, Louzir et al. 2001).

Deux isolats, MHOM/TN/94/GLC94 et MHOM/TN/94/GLC67 (GLC94 et GLC67 respectivement) qui induisent des lésions graves, évoluant rapidement et représentant les isolats les plus virulents et 2 isolats MHOM/TN/94/GLC07 et MHOM/TN/94/GLC32 (GLC07 et GLC32 respectivement), induisant une maladie expérimentale moins sévère et représentant des isolats peu virulents, ont été sélectionnés pour poursuivre la recherche de gènes de virulence potentiellement exprimés à des niveaux différents suivant les souches.

Exemple 2 : Identification par « Differential Display », d'une nouvelle protéine disulfide isomérase LmPDI de *Leishmania major*, impliquée dans la virulence naturelle du parasite

1. Identification des gènes différenciellement exprimés dans les isolats virulents et les isolats peu virulents de *L. major*

Les ARNm ont été tout d'abord purifiés à partir des promastigotes de deux isolats très virulents (GLC94 et GLC67) et de deux isolats peu virulents (GLC 32 et 07) puis reverse-transcrits en ADNc en utilisant des amorces Oligo(dT)₁₁MN, avec M= A ou C ou G et N= A ou C ou G ou T. L'amorce utilisée lors des expériences de differential display est :

Les réactions d'amplification ont été réalisées par PCR à l'aide des mêmes oligo-dT utilisés lors de la réaction de reverse transcription et combinés avec 10 amorces arbitraires, telles que décrites dans la littérature scientifique (Liang and Pardee 1992; Liang, Bauer et al. 1995; Heard, Lewis et al. 1996).

Au total, 60 combinaisons d'amorces ont été réalisées et analysées. L'analyse sur gel de polyacrylamide des produits d'amplification utilisant différentes combinaisons d'amorces a permis de montrer que les gènes des différents isolats de *L. major* (très virulents et peu virulents) expriment, dans approximativement 95% des cas, les mêmes ARNm à des niveaux équivalents. Seuls, 25 messagers semblent être différenciellement exprimés

entre les isolats très virulents et peu virulents (figure 1A). Les ADNc différentiellement exprimés ont été tout d'abord isolés du gel d'acrylamide puis réamplifiés à l'aide des mêmes combinaisons d'amorce utilisées lors de la première PCR et enfin, clonés dans le vecteur pMOS. Le séquençage des différents clones a permis de montrer qu'un certain nombre d'entre eux étaient identiques.

L'analyse de l'ARNm issu des différents isolats de *L. major* par Northern blot en utilisant les 14 fragments différentiellement exprimés comme sonde a permis de montrer que 3 clones parmi les 14 isolés présentent une expression différentielle entre les isolats très virulents et les isolats peu virulents. Un de ces clones, le clone p14, a été caractérisé. Par Northern blot, la sonde correspondant au clone p14 s'hybride spécifiquement avec un transcrit de taille approximative de 2,2kb, qui est préférentiellement exprimé dans les 2 isolats les plus virulents par rapport aux 2 isolats les moins virulents (figure 1B). Ceci confirme le résultat obtenu par la technique de *Differential Display*. Le clone p14 a été entièrement séquencé et la taille de ce clone est de 339pb. La comparaison de la séquence nucléotidique de ce fragment avec les séquences décrites dans les banques de données (GenBank et EMBL) n'a pas permis d'identifier de séquence significativement homologue. Ceci peut être dû au fait que le clone p14 correspond à la région 3' terminale non traduite du messager.

2. Clonage et analyse de la séquence entière de l'ADNc p14

Pour isoler la séquence entière de l'ADNc correspondant au clone p14, le fragment de 339pb a été utilisé pour cribler une banque d'ADNc de promastigotes de l'isolat GLC94. Deux clones positifs ont été isolés à partir de 6×10^5 clones recombinants analysés. La figure 2 montre la séquence nucléotidique du clone le plus long, qui est de 2094pb (SEQ ID No :1). Ce clone présente un cadre de lecture ouvert codant pour un polypeptide de 477 acides aminés (aa), avec un poids moléculaire théorique de 52,4 kDa

et un point isoélectrique de 5,22. La région N-terminale de cette protéine correspond à un peptide signal potentiel d'export vers le réticulum endoplasmique, de 20 aa. La région 5' non traduite contient une séquence « *splice leader* » caractéristique des *Leishmania* et la région 3' non traduite
5 contient une queue poly A précédée d'un site potentiel de polyadénylation (figure 2).

La séquence peptidique du clone isolé montre 27-36% d'identité avec les protéines de la famille des Protéine Disulfide Isomérases (PDI et Erp) de plusieurs espèces (figure 3). De plus, cette protéine contient deux régions
10 aux résidus 47-52 et 381-386 qui sont identiques aux sites actifs potentiels (Cys-Gly-His-Cys, ou CGHC) des PDI, Erp et protéines de la famille des thioredoxines. La partie C-terminale montre un signal potentiel de rétention dans le réticulum endoplasmique de type KDEL (EEDL) aux résidus 474-477 suggérant que, comme les PDI et Erp, cette protéine se retrouve dans
15 la lumière du réticulum endoplasmique. P14 est donc une protéine de la famille des Protéine Disulfide isomérases de *L. major*. Elle a été dénommée LmPDI (figure 2 et 3).

Pour déterminer si la LmPDI est dotée d'une activité thio-disulfide oxydo-réductase comme cela a été démontré pour la plupart des protéines
20 disulfide isomérases décrites, la capacité de la protéine recombinante LmPDI à renaturer la RNase A dénaturée a été étudiée. La protéine recombinante LmPDI a été synthétisée chez *E. coli* puis purifiée et utilisée dans un test, *in vitro*, de réactivation de la Rnase. Les résultats obtenus
25 montrent que la LmPDI est capable de restaurer l'activité RNase A de manière similaire à celle de la PDI bovine, utilisée comme contrôle (figure 4)

Pour identifier le nombre de copies du gène codant pour le LmPDI, les inventeurs ont effectué une hybridation de type Southern blot en utilisant comme sonde le fragment d'ADNc de la LmPDI marquée au ³²P. Les

5 résultats obtenus montrent généralement une bande unique, sauf pour les enzymes qui présentent un site de coupure au sein de l'ADNc de la LmPDI (figure 5A). Le gène codant pour la LmPDI est donc probablement présent en une copie unique dans le génome de *L. major*. De plus, le gène de la LmPDI apparaît conservé dans différentes espèces de *Leishmania* testées (*Leishmania infantum*, dermatrope, et un viscérotrope, *Leishmania donovani*) (figure 5B).

3. Analyse par immunoblot de l'expression de la LmPDI

10 Pour caractériser l'expression de la protéine native, un lapin a été immunisé avec la protéine recombinante LmPDI synthétisée chez *E. coli* et purifiée par chromatographie d'affinité. Par immunoblot, les inventeurs ont montré que l'anticorps polyclonal anti-LmPDI obtenu reconnaît fortement une protéine de la taille attendue (55kDa) dans les lysats de promastigotes en phase stationnaire de croissance de GLC94 (figure 6). D'autre part, 15 deux autres protéines sont détectées. La première présente un poids moléculaire de 10 5kDa, ce qui correspond à environ deux fois celui de la LmPDI, et la deuxième a un poids moléculaire de 35 kDa. Afin de vérifier si la protéine de 105 kDa correspond à un dimère de la LmPDI, une analyse de lysats de promastigotes de GLC94 dénaturés en présence de fortes 20 concentrations de DTT (0.5mM) a été effectuée. Dans ces conditions, l'anti-LmPDI ne détecte plus de protéines à 105 kDa. Ces résultats suggèrent que la LmPDI s'organise en oligomères. La protéine de 35 kDa semble être un contaminant. En effet, l'anti-LmPDI purifié sur colonne d'affinité (Sephacrose 4B-LmPDI) ne reconnaît plus la protéine de 35 kDa (figure 6).

25 Afin de comparer le niveau d'expression de la LmPDI entre les isolats les plus virulents et les moins virulents, les protéines de promastigotes ont été extraites puis quantifiées en phase stationnaire de croissance. 5µg de protéines ont été analysés sur un gel à 12% de polyacrylamide-SDS et transférés sur une membrane de nitrocellulose. L'analyse par Western blot

à l'aide de l'anticorps anti-LmPDI montre que la LmPDI (55kDa) et son dimère (105kDa) sont plus fortement exprimés dans les isolats les plus virulents (figure 7). En revanche, la protéine contaminante de 35kDa est exprimée de manière équivalente quelle que soit la souche testée. Ces résultats suggèrent une corrélation entre le niveau d'expression de la LmPDI et le pouvoir pathogène des isolats étudiés.

Exemple 3 : Induction par la LmPDI de la prolifération *in vitro* de cellules mononucléées d'individus ayant des lésions actives ou des antécédents de LCZ

La LmPDI de *L. major*, vu son expression importante au cours du stade infectieux du parasite, pourrait être la cible d'une réponse immune cellulaire. Afin de vérifier la pertinence de cette hypothèse, la capacité de la LmPDI à induire une réponse immune cellulaire a été évaluée, par des expériences de prolifération de cellules mononucléées obtenues d'individus ayant des lésions actives ou des antécédents de LCZ.

Cette étude a été réalisée chez 37 individus vivants à El Guettar (sud de la Tunisie) pour lesquels le résultat du test de prolifération cellulaire contre les antigènes totaux du parasite (SLA, test indiquant un contact antérieur avec le parasite) est disponible. Ces individus se répartissent comme suit :

Groupe 1 : composé de 8 individus ayant un test SLA négatif

Groupe 2 : composé de 29 individus ayant un test SLA positif

Les cellules mononucléées, comprenant les lymphocytes et les monocytes sont séparées à partir sang périphérique par centrifugation sur gradient de ficoll /Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Sweden).

Le résultat (figure 8) montre une prolifération significative avec les individus immuns.

L'induction des cytokines (IFN- γ IL-4) dans les surnageants de culture de PBMC a été faite par incubation pendant 48 heures des cellules mononucléées avec la même concentration de LmPDI et le dosage a été réalisé par un test ELISA utilisant des anticorps monoclonaux anti-IL-4 et anti-IFN- γ humaines (Pharmingen, San Diego, CA).

Les résultats ont été réalisés sur un échantillon faible d'individus. Ils montrent clairement l'absence d'IL-4 et la présence de taux significatifs d'IFN- γ dans le surnageant des cellules stimulées par la LmPDI.

Ce résultat montre une réponse essentiellement de type Th1, indiquant que la LmPDI pourrait constituer un candidat-vaccin contre les leishmanioses.

Exemple 4 : Inhibition de la croissance de *L. major* en milieu liquide, en présence d'un inhibiteur des PDI

La bacitracine est un inhibiteur connu des PDI. Des expériences utilisant la bacitracine montrent qu'à la concentration finale de 2 mM, la bacitracine inhibe complètement la croissance des parasites *L. major* en milieu liquide (figure 9).

Ces expériences ont été effectuées dans les conditions expérimentales suivantes :

a) Préparation de la RNase A réduite et dénaturée :

20mg de Ribonucléase (RNase A) purifiée ont été réduits et dénaturés à température ambiante pendant 18 heures dans un tampon contenant 0.15M de DTT, 6M de guanidine-HCl et 0.1M de Tris-HCl à pH 8.6, avant d'être purifiés sur une colonne de sephadex G-25 équilibrée dans du 0.01M HCl. La concentration des fractions de RNase A réduite et dénaturée a été déterminée à l'aide du coefficient d'extinction de 9200 M⁻¹cm⁻¹ à 275nm. Les fractions sont conservées à -80°C pendant deux semaines.

b) Réactivation de la RNase A en présence de la protéine recombinante LmPDI :

La RNase A réduite et dénaturée (8 μ M) a été incubée dans un tampon contenant 4.5 mM (cCMP), 1 mM Glutathione GSH, 0.2 mM Glutathione disulfide GSSH, 2 mM EDTA et 100 mM Tris-HCl pH 8 en présence de Sérum albumine bovine (BSA) (1,4 μ M) comme contrôle négatif, de Protéine Disulfide Isomérase bovine (1,4 μ M) comme contrôle positif, ou de LmPDI recombinante (1,4 μ M) pendant 30 minutes à 25°C. La réactivation de la RNase A est déterminée par la mesure de l'activité RNase A à 296 nm toutes les 5 minutes pendant 30 minutes comme précédemment décrit dans la littérature (Lyles and Gilbert 1991).

c) Tests d'inhibition *in-vitro* de l'activité thio-disulfide oxydo-réductase de la LmPDI recombinante par différents inhibiteurs de PDI :

Les conditions d'expériences relatives aux tests d'inhibition de l'activité thio-disulfide oxydo-réductase de la LmPDI recombinante sont strictement identiques à celles décrites dans le paragraphe (Réactivation de la RNase A en présence de la protéine recombinante LmPDI), excepté le fait que les réactions sont réalisées en présence de 0.01 mM, 0.1 mM, 0.5 mM et 2 mM des inhibiteurs de PDI suivants :

- la bacitracine
- la bacitracine de zinc
- le p-chloromercuribenzoic acid (pCMBA)
- l'acide tocinoic.

d) Inhibition de la croissance des parasites (*L. major*) en milieu liquide

Dans le but de déterminer l'effet de la bacitracine (BAC), de la bacitracine de zinc (BACZn), du p-chloromercuribenzoic acid (pCMBA) et du 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) sur la croissance *in-vitro*

des leishmanies en milieu liquide, différentes concentrations d'inhibiteurs cités ci-dessus 0mM, 0.05mM, 0.1mM, 0.2mM, 0.5mM, 1mM, 1.5mM, 2mM, 2.5mM et 5mM sont additionnés dans du RPMI additionné de 5% de sérum de veau fœtal et contenant $2 \cdot 10^6$ /ml de parasites en phase exponentielle de croissance. Les parasites sont incubés à 26°C et comptés toutes les 24 heures pendant 96 heures. Le comptage des parasites est réalisé sur cellules de Mallassez.

Exemple 5 : Evaluation de molécules inhibitrices de LmPDI dans leurs capacités à supprimer la croissance de *Leishmania major*

La mise en valeur du rôle de la LmPDI dans la virulence de *Leishmania* permet d'envisager des nouvelles stratégies de recherche de molécules actives pour soigner les leishmanioses. En effet, il est probable que des molécules connues pour leur activités anti-PDI, autres que la bacitracine, soient capables d'inhiber la croissance du parasite. Un exemple de protocole d'évaluation de molécules potentiellement efficaces contre *Leishmania* est présenté ici.

L'évaluation de molécules connues pour leurs activités anti-PDI, ou celles qui seront nouvellement identifiées, peut se faire en trois étapes. Au cours de la première étape, les molécules sont testées *in vitro* sur la protéine LmPDI recombinante produite dans *Escherichia (E.) coli*. Ensuite, des tests d'inhibition de la croissance des parasites en milieu liquide sont réalisés et enfin, les molécules sont testées dans le modèle murin de la leishmaniose expérimentale.

1- Evaluation de l'inhibition de la LmPDI recombinante. La technique détaillée de l'analyse de l'activité PDI de LmPDI est décrite dans l'exemple 2 et dans les Matériels et Méthodes ci-dessus. La même technique peut être utilisée pour évaluer la capacité qu'ont certains inhibiteurs des PDI connus ou à identifier (n utilisant un modèle moléculaire de la LmPDI), en

rajoutant dans le volume réactionnel différentes concentrations d'inhibiteurs potentiels. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition par rapport au tampon seul. Ne sont retenues que les molécules qui ont une activité inhibitrice de LmPDI significative et dose-dépendante.

5 Dans le but de déterminer si les différents inhibiteurs de PDI décrits dans la littérature pouvaient inhiber l'activité thio-disulfide oxydo-réductase de la LmPDI, la capacité de ces inhibiteurs à bloquer l'activité enzymatique de la LmPDI synthétisée chez *E. coli* puis purifiée a été étudiée dans un test *in-vitro*, à différentes concentrations. Les inhibiteurs sont :

- 10
- la bacitracine
 - la bacitracine de zinc
 - le p-chloromercuribenzoic acid (pCMB)
 - l'acide tocinoïque.

15 Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 10 et montrent que l'activité LmPDI est complètement inhibée en présence de 0.01mM de pCMB et de 2mM de bacitracine ou de bacitracine de zinc. En revanche, l'acide tocinoïque ne semble pas avoir un effet très important sur l'activité de la LmPDI aux concentrations utilisées (concentrations qui inhibent totalement l'activité de la PDI humaine).

20 2- Inhibition de la croissance des parasites (*L. major*) en milieu liquide. La molécule à tester est dissoute dans le solvant approprié, selon ses propriétés physico-chimiques (solubilité dans les solutions aqueuses ou les solvants organiques). Dans tous les cas, le solvant seul est utilisé comme contrôle. Les expériences peuvent, par exemple, être réalisées sur l'isolat

25 *L. major* GLC94. La composition du milieu de culture est détaillée ci-dessus (exemple 2, et Matériels et Méthodes). Les cultures sont incubées à 26°C et repiquées régulièrement pour maintenir les parasites en phase stationnaire de croissance. Pour certaines expériences, le stade amastigote-like du parasite est utilisé. Dans ce cas, les parasites

30 (promastigotes) de la phase stationnaire de croissance sont centrifugés, le

milieu est remplacé par le Schneider Drosophila medium ajusté à pH 5.0 et additionné de 15% de sérum de veau foetal (SVF). Les cultures sont ensuite incubées sous 5% de CO₂ à 35°C.

5 L'inhibition de la croissance des promastigotes de *L. major* se fait sur les parasites pris en phase de croissance exponentielle, ajustés à la concentration initiale de 10⁶ parasites/ml de milieu complet et incubés à raison de 100 µl / puits dans les plaques de cultures de 96 puits en l'absence ou en présence de différentes concentrations de la molécule à tester. Les parasites sont incubés sous 5% de CO₂ à 26°C et comptés
10 toutes les 24h pendant 96h. Le comptage des parasites se fait sur cellule de Mallassez. Alternativement, un hémocytomètre peut être utilisé. Toutes les mesures sont faites en triplicata. La capacité inhibitrice d'une molécule est appréciée en concentration inhibitrice qui réduit la division cellulaire par 50% par rapport au contrôle (IC50).

15 L'évaluation de la réduction de la viabilité des amastigotes se fait grâce à un test fluorométrique utilisant Almar Blue comme indicateur de viabilité/croissance.

Les inhibiteurs de PDI décrits dans le paragraphe (1-) ont été testés dans le but d'évaluer leurs capacités à inhiber la croissance *in-vitro* des parasites.
20 Pour cela, différentes quantités d'inhibiteurs sont additionnés dans du RPMI contenant 2.10⁶/ml de parasites en phase exponentielle de croissance. Les parasites sont incubés à 26°C et comptés toutes les 24 heures pendant 96 heures. Le comptage des parasites est réalisé sur cellules de Mallassez. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure
25 11 et montrent que la bacitracine, la bacitracine de zinc ou le pCMBA inhibent entièrement la croissance des leishmanies aux concentrations 5 mM et 2 mM et 0,5 mM respectivement. En revanche, le 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) aux concentrations utilisées (concentrations qui

inhibent totalement l'activité de la PDI humaine) ne semble pas avoir un effet très important sur la croissance des leishmanies.

3- Evaluation de l'efficacité des inhibiteurs pré sélectionnés dans le modèle expérimental de l'infection des souris sensibles BALB/c par *L. major*.

Les expériences *in vivo* vont dépendre de la toxicité et des propriétés physico-chimiques des molécules à tester. Les souris BALB/c seront infectées par 10^6 promastigotes de *L. major* obtenus durant la phase stationnaire de croissance et injectés (dans un volume de 50µl) dans le coussinet plantaire de la patte arrière droite. La mesure du diamètre des lésions se fera de façon hebdomadaire grâce à l'utilisation d'un pied à coulisse.

En tout, trois protocoles thérapeutiques seront appliqués selon les cas :

- Pour les molécules hydrophobes, qui diffusent bien, peu ou pas toxiques, le produit sera injecté à différentes concentrations et selon différents schémas par voie intra-péritonéale. La fréquence des injections dépendra de la bio-disponibilité de la molécule ainsi que sa demi-vie. Dans tous les cas, le protocole sera arrêté au bout de 9 semaines après infection.
- Pour les molécules hydrosolubles et relativement toxiques, les injections se feront en intra-lésionnel (en général, les doses actives peuvent être divisées par 10), par au moins quatre injections au niveau de la zone indurée.
- Pour les molécules liposolubles, une pommade sera testée par application quotidienne sur la lésion expérimentale.

Globalement, et quelle que soit la voie d'injection du produit à tester, deux types de protocoles seront effectués :

- un protocole qui démarre immédiatement après injection des parasites,

- un protocole qui démarre 4 à 5 semaines après injection des parasites, à un moment où la lésion sera déjà établie.

Dans tous les cas, à la fin du protocole, les souris seront sacrifiées, une estimation de la charge parasitaire se fera au niveau du site d'injection et dans le ganglion qui draine la lésion.

Exemple 6 : Infection *in vitro* de macrophages murins par *Leishmania*

Des macrophages murins de moelle osseuse (*murine bone marrow macrophages*, ou MBMM) sont obtenus à partir de moelle osseuse extrudée d'un fémur ou d'un tibia de souris BALB/c femelles. Les MBMM sont cultivées en plaques multi-chambres à $1,5 \times 10^3$ cellules par puits dans 500 μ l de milieu complet. Pour stimuler la croissance et la maturation des MBMM, le milieu de culture est supplémenté avec 20% de milieu conditionné avec des fibroblastes L-929, comme source de facteur stimulateur de colonie de macrophages (*macrophage colony stimulating factor*, ou MCSF). Après 6 jours de culture à 37°C et 5% CO₂, le milieu est enlevé, les MBMM sont lavées, et du milieu RPMI frais avec 10% de sérum de veau fœtal, mais ne comportant pas de milieu conditionné par des fibroblastes L-929, est ajouté. Des amastigotes intra-lésionnels sont purifiés à partir de lésions non-ulcérées, par centrifugation différentielle, et comptés en utilisant le colorant viral bleu trypan. Ces parasites sont utilisés pour infecter les MBMM à un ratio final de quatre parasites par macrophage. Deux heures après l'addition des parasites, les macrophages sont rincés cinq fois avec du PBS pour éliminer les amastigotes non phagocytés. Les cultures sont ensuite incubées à 37°C dans 95% d'air et 5% de CO₂. Les expériences sont effectuées à différents points dans le temps : 30 minutes et 2, 24 et 72 heures. Aux temps indiqués, les puits sont rincés avec du PBS, les couvercles sont enlevés, et les macrophages infectés sont fixés à l'éthanol pendant 1 heure à température ambiante. Les plaques sont ensuite lavées et colorées au Giemsa pour suivre l'infection.

L'énumération des macrophages infectés est réalisée au centre de chaque puits, où les cellules sont bien étalées et où les parasites peuvent être facilement énumérés. A ce niveau de la plaque, le ratio parasite/macrophage peut être supérieur à 4.

5 **Exemple 7 : Inhibition de l'activité enzymatique de la LmPDI recombinante par des inhibiteurs de Protéines Disulfide Isomérases**

Plusieurs inhibiteurs de Protéines Disulfide Isomérases (PDI) ont été décrits dans la littérature (Ryser *et al.* 1994, Orlandi 1997, Mou *et al.* 1998). Parmi ceux-ci, la bacitracine et la bacitracine de zinc constituent un
10 complexe d'antibiotiques polypeptidiques produits par *Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis*. La bacitracine A est le composé principal de la bacitracine commerciale, qui est un mélange d'au moins neuf bacitracines. Cet antibiotique est capable d'inhiber la synthèse de la paroi de
15 nombreuses bactéries Gram+, mais également l'activité de plusieurs protéases telles que PDI, transglutaminase, papaïne et neuropeptidase. La plupart de ces protéases ont un résidu cystéine dans leur site actif.

Dans un premier temps, les inventeurs ont testé l'effet de ces inhibiteurs pour vérifier leur capacité éventuelle à altérer l'activité enzymatique de la LmPDI recombinante (rLmPDI) *in vitro*.

20 La technique de la *scrambled* RNase (RNase réduite et dénaturée), décrite précédemment (Lyles et Gilbert, 1991), a été utilisée pour mettre en évidence l'activité de la LmPDI. Vingt milligrammes de RNase A (Amersham-Pharmacia) ont été dénaturés dans un tampon composé de 0,15M Dithiothréitol, 6M Guanidine HCl et 0,1M Tris-Cl pH8,6 pendant 18
25 heures à température ambiante. La RNase dénaturée et réduite a ensuite été purifiée sur une colonne de Séphadex G25 équilibrée dans du HCl 0,01M et quantifiée par spectrophotométrie à 275nm.

Dans un tampon réducteur à base de glutathione, la PDI catalyse la renaturation de la RNase réduite et dénaturée (Gilbert 1998). La
30 restauration de l'activité RNase a été mesurée par spectrophotométrie n

présence de cytidine 2'-3'-cyclic monophosphate (cCMP) comme substrat. Ainsi, 8 μ M de RNase réduite et d' nature seule ou en présence de 1,4 μ M d'albumine bovine (BSA) ou de 1,4 μ M de rLmPDI ont été mélangés dans un tampon contenant 4,5 mM cCMP, 1 mM de glutathione réduite (GSH), 200 μ M de glutathione oxydée (GSSG), 2 mM EDTA et 100 mM Tris-Cl pH8. La réaction s'est effectuée à température ambiante pendant 30 minutes. L'hydrolyse du cCMP résultant de la renaturation de la RNase a été enregistrée par la mesure de l'absorbance à 296 nm toutes les 5 minutes pendant la demi-heure de réaction.

L'activité de la LmPDI recombinante (rLmPDI) a été mesurée en présence de différentes concentrations de bacitracine (BAC 0,01 mM-2 mM) et de bacitracine de zinc (BACZn 0,01 mM-2 mM). Les résultats sont montrés à la figure 12.

Ces résultats montrent que la bacitracine et la bacitracine de zinc ont des effets similaires. Ainsi, en présence de ces deux produits, 50% d'inhibition est observée à 0,1 mM, 70% à 0,5 mM et 100% à 2 mM. Les concentrations qui inhibent la rLmPDI sont comparables à celles décrites dans la littérature comme inhibitrices de PDI d'autres espèces.

Exemple 8 : Cinétique de croissance *in vitro* des promastigotes de *L. major* en présence de Bacitracine de Zinc

Les inventeurs ont ensuite testé l'effet de la bacitracine de zinc sur la cinétique de croissance *in vitro* de promastigotes de *L. major*. Pour cette étude, seule la bacitracine de zinc a été testée, d'une part parce qu'elle présente le même profil d'inhibition de l'activité enzymatique de la rLmPDI que la bacitracine, et d'autre part, parce que la bacitracine est plus stable et moins toxique lorsqu'elle est couplée au zinc.

Pour ce faire, les promastigotes de l'isolat GLC94 ont été mis en culture sur du milieu à bas de sérum de lapin coagulé pendant deux jours. Par la suite, les parasites (2×10^6 parasites par ml) ont été transférés dans du milieu complet comprenant la bacitracine de zinc BACZn, à 1 ; 1,5 et 2,5

mM. Des promastigotes cultivés dans du milieu complet en l'absence d'inhibiteurs ont été utilisés comme contrôle. Le suivi s'est fait par comptage des parasites à 48, 72 et 96 heures. Les résultats sont montrés à la figure 13.

Ces résultats montrent que la bacitracine de zinc inhibe partiellement la croissance des parasites à 1,5 mM et totalement à 2 mM et à 5 mM, alors qu'elle n'a aucun effet à 1 mM. Il est donc très intéressant de noter que cette molécule est capable de bloquer la prolifération de parasites *L. major* en culture.

Exemple 9 : Inhibition de la croissance des promastigotes de *L. major* chez la souris BALB/c, en présence de Bacitracine de Zinc

La disponibilité de la bacitracine de zinc, qui fait déjà partie de l'arsenal thérapeutique, a permis de tester son effet sur l'évolution de l'infection de souris BALB/c par *L. major*. Ainsi, des souris ont été infectées avec des promastigotes en phase stationnaire de croissance (10^6 promastigotes par

patte) de l'isolat GLC94 dans le coussinet plantaire de la patte arrière et traitées avec une pommade à base de 5 mM ou 25 mM de BACZn (préparées dans de la vaseline). Le traitement par la pommade a été démarré 48 heures après injection des parasites, à raison d'une application par jour pendant 5 jours par semaine. Des souris infectées de la même manière et traitées avec de la vaseline ont été utilisées comme contrôle. La taille des lésions a été mesurée chaque semaine. Les résultats sont montrés dans la figure 14.

Bien que préliminaires, ces résultats montrent que la bacitracine de zinc atténue la progression de la maladie lorsqu'elle est appliquée localement sous forme de pommade, au niveau du site d'injection des souris BALB/c. Il est à souligner que dans le groupe des souris traitées, l'atténuation de la lésion est observée chez 2 sur les 3 souris traitées avec de la bacitracine 5 mM et 2 sur les 4 souris traitées avec de la bacitracine 25 mM. La reprise de la maladie clinique après arrêt du traitement, est attendue dans la

5 mesure où les souris BALB/c sont incapables d'éliminer totalement le parasite et que même les traitements utilisés chez l'homme (Glucantime et paramomycine) ont peu d'effets sur la maladie induite chez la souris BALB/c, chez qui la disparition totale des parasites n'a jamais été observée.

La LmPDI peut donc être considérée comme une cible potentielle de chimiothérapie anti-leishmanienne, et il apparaît que la bacitracine est potentiellement efficace contre *L. major*.

BIBLIOGRAPHIE

5 Beverley, S. M. and S. J. Turco (1998). "Lipophosphoglycan (LPG) and the identification of virulence genes in the protozoan parasite *Leishmania*." Trends Microbiol 6(1): 35-40.

Chakrabarty, R., S. Mukherjee, et al. (1996). "Kinetics of entry of virulent and avirulent strains of *Leishmania donovani* into macrophages: a possible role of virulence molecules (gp63 and LPG)." J Parasitol 82(4): 632-5.

10 Cotrim, P. C., L. K. Garritty, et al. (1999). "Isolation of genes mediating resistance to inhibitors of nucleoside and ergosterol metabolism in *Leishmania* by overexpression/selection." J Biol Chem 274(53): 37723-30.

15 De, T. and S. Roy (1999). "Infectivity and attenuation of *Leishmania donovani* promastigotes: association of galactosyl transferase with loss of parasite virulence." J Parasitol 85(1): 54-9.

Descoteaux, A., Y. Luo, et al. (1995). "A specialized pathway affecting virulence glycoconjugates of *Leishmania*." Science 269(5232): 1869-72.

20 Desjardins, M. and A. Descoteaux (1997). "Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan." J Exp Med 185(12): 2061-8.

25 Desjardins, M. and A. Descoteaux (1998). "Survival strategies of *Leishmania donovani* in mammalian host macrophages." Res Immunol 149(7-8): 689-92.

Dumas, C., M. Ouellette, et al. (1997). "Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages." Embo J **16**(10): 2590-8.

5 Ferrari, D. M. and H. D. Soling (1999). "The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds." Biochem J **339**(Pt 1): 1-10.

Frand, A. R., J. W. Cuozzo, et al. (2000). "Pathways for protein disulphide bond formation." Trends Cell Biol **10**(5): 203-10.

10 Garami, A. and T. Ilg (2001). "The role of phosphomannose isomerase in *Leishmania mexicana* glycoconjugate synthesis and virulence." J Biol Chem **276**(9): 6566-75.

Gilbert, H. F. (1998). "Protein disulfide isomerase." Methods Enzymol **290**: 26-50.

15 Heard, P. L., C. S. Lewis, et al. (1996). "*Leishmania mexicana amazonensis*: differential display analysis and cloning of mRNAs from attenuated and infective forms." J Eukaryot Microbiol **43**(5): 409-15.

Hubel, A., S. Krobitsch, et al. (1997). "*Leishmania major* Hsp100 is required chiefly in the mammalian stage of the parasite." Mol Cell Biol **17**(10): 5987-95.

20 Hultgren, S. J., S. Abraham, et al. (1993). "Pilus and nonpilus bacterial adhesins: assembly and function in cell recognition." Cell **73**(5): 887-901.

Ilg, T. (2000). "Proteophosphoglycans of *Leishmania*." Parasitol Today **16**(11): 489-97.

Ilg, T., M. Demar, et al. (2001). "Phosphoglycan Repeat-deficient *Leishmania mexicana* Parasites Remain Infectious to Macrophages and Mice." J Biol Chem **276**(7): 4988-97.

5 Kebaïer, C., H. Louzir, et al. (2001). "Heterogeneity of wild *Leishmania* major isolates in experimental murine pathogenicity and specific immune response." Infection and Immunity **69**(8).

Khalil, E. A., A. M. El Hassan, et al. (2000). "Autoclaved *Leishmania* major vaccine for prevention of visceral leishmaniasis: a randomised, double-blind, BCG-controlled trial in Sudan." Lancet **356**(9241): 1565-9.

10

Liang, P., D. Bauer, et al. (1995). "Analysis of altered gene expression by differential display." Methods Enzymol **254**: 304-21.

Liang, P. and A. B. Pardee (1992). "Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction." Science **257**(5072): 967-71.

15

Lira, R., S. Sundar, et al. (1999). "Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*." J Infect Dis **180**(2): 564-7.

20 Louzir, H., P. C. Melby, et al. (1998). "Immunologic determinants of disease evolution in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania* major." J Infect Dis **177**(6): 1687-95.

Lyles, M. M. and H. F. Gilbert (1991). "Catalysis of the oxidative folding of ribonuclease A by protein disulfide isomerase: dependence of the rate on the composition of the redox buffer." Biochemistry **30**(3): 613-9.

25

Lyles, M. M. and H. F. Gilbert (1991). "Catalysis of the oxidative folding of ribonuclease A by protein disulfide isomerase: pre-steady-state kinetics and the utilization of the oxidizing equivalents of the isomerase." Biochemistry **30**(3): 619-25.

5 Martin, J. L. (1995). "Thioredoxin—a fold for all reasons." Structure **3**(3): 245-50.

McKerrow, J. H., J. C. Engel, et al. (1999). "Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections." Bioorg Med Chem **7**(4): 639-44.

10 Mottram, J. C., D. R. Brooks, et al. (1998). "Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and Leishmania in host- parasite interactions." Curr Opin Microbiol **1**(4): 455-60.

15 Mottram, J. C., A. E. Souza, et al. (1996). "Evidence from disruption of the *Imcpb* gene array of *Leishmania mexicana* that cysteine proteinases are virulence factors." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(12): 6008-13.

Mou, Y., H. Ni, et al. (1998). "The selective inhibition of beta 1 and beta 7 integrin-mediated lymphocyte adhesion by bacitracin." J Immunol **161**(11): 6323-9.

20 Mukhopadhyay, S., P. Sen, et al. (1998). "Reduced expression of lipophosphoglycan (LPG) and kinetoplastid membrane protein (KMP)-11 in *Leishmania donovani* promastigotes in axenic culture." J Parasitol **84**(3): 644-7.

25 Noiva, R. (1999). "Protein disulfide isomerase: the multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum." Semin Cell Dev Biol **10**(5): 481-93.

Orlandi, P. A. (1997). "Protein-disulfide isomerase-mediated reduction of the A subunit of cholera toxin in a human intestinal cell line." J Biol Chem **272**(7): 4591-9.

5 Ostermeier, M., K. De Sutter, et al. (1996). "Eukaryotic protein disulfide isomerase complements *Escherichia coli* dsbA mutants and increases the yield of a heterologous secreted protein with disulfide bonds." J Biol Chem **271**(18): 10616-22.

10 Paramchuk, W. J., S. O. Ismail, et al. (1997). "Cloning, characterization and overexpression of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Leishmania chagasi*: role in pathogenesis." Mol Biochem Parasitol **90**(1): 203-21.

15 Peek, J. A. and R. K. Taylor (1992). "Characterization of a periplasmic thiol:disulfide interchange protein required for the functional maturation of secreted virulence factors of *Vibrio cholerae*." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(13): 6210-4.

20 Perez-Victoria, J. M., F. J. Perez-Victoria, et al. (2001). "High-affinity binding of silybin derivatives to the nucleotide-binding domain of a *Leishmania tropica* P-glycoprotein-like transporter and chemosensitization of a multidrug-resistant parasite to daunomycin." Antimicrob Agents Chemother **45**(2): 439-46.

Ryser, H. J., E. M. Levy, et al. (1994). "Inhibition of human immunodeficiency virus infection by agents that interfere with thiol-disulfide interchange upon virus-receptor interaction." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(10): 4559-63.

25 Ryan, K. A., L. A. Garraway, et al. (1993). "Isolation of virulence genes directing surface glycosyl- phosphatidylinositol synthesis by functional complementation of *Leishmania*." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(18): 8609-13.

Sacks, D. L., G. Modi, et al. (2000). "The role of phosphoglycans in Leishmania-sand fly interactions." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(1): 406-11.

5 Selzer, P. M., X. Chen, et al. (1997). "Leishmania major: molecular modeling of cysteine proteases and prediction of new nonpeptide inhibitors." Exp Parasitol **87**(3): 212-21.

Sharifi, I., A. R. FeKri, et al. (1998). "Randomised vaccine trial of single dose of killed Leishmania major plus BCG against anthroponotic cutaneous leishmaniasis in Bam, Iran." Lancet **351**(9115): 1540-3.

10 Spath, G. F., L. Epstein, et al. (2000). "Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite Leishmania major." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(16): 9258-63.

15 Streit, J. A., T. J. Recker, et al. (2001). "Protective immunity against the protozoan Leishmania chagasi is induced by subclinical cutaneous infection with virulent but not avirulent organisms." J Immunol **166**(3): 1921-9.

Titus, R. G., F. J. Gueiros-Filho, et al. (1995). "Development of a safe live Leishmania vaccine line by gene replacement." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(22): 10267-71.

20 Wang, Y., E. S. Bjes, et al. (2000). "Molecular aspects of complement-mediated bacterial killing. Periplasmic conversion of C9 from a protoxin to a toxin." J Biol Chem **275**(7): 4687-92.

25 Wiese, M. (1998). "A mitogen-activated protein (MAP) kinase homologue of Leishmania mexicana is essential for parasite survival in the infected host." Embo J **17**(9): 2619-28.

Yu, J. (1998). "Inactivation of DsbA, but not DsbC and DsbD, affects the intracellular survival and virulence of *Shigella flexneri*." Infect Immun **66**(8): 3909-17.

5 Yu, J., B. Edwards-Jones, et al. (2000). "Key role for DsbA in cell-to-cell spread of *Shigella flexneri*, permitting secretion of Ipa proteins into interepithelial protrusions." Infect Immun **68**(11): 6449-56.

Yu, J. and J. S. Kroll (1999). "DsbA: a protein-folding catalyst contributing to bacterial virulence." Microbes Infect **1**(14): 1221-8.

10 Yu, J., H. Webb, et al. (1992). "A homologue of the *Escherichia coli* DsbA protein involved in disulphide bond formation is required for enterotoxin biogenesis in *Vibrio cholerae*." Mol Microbiol **6**(14): 1949-58.

15 Zhang, H. Z. and M. S. Donnenberg (1996). "DsbA is required for stability of the type IV pilin of enteropathogenic *Escherichia coli*." Mol Microbiol **21**(4): 787-97.

Zhang, W. W. and G. Matlashewski (1997). "Loss of virulence in *Leishmania donovani* deficient in an amastigote-specific protein, A2." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(16): 8807-11.

REVENDICATIONS

1. Protéine impliquée dans la virulence de *Leishmania*, comportant au moins un site (Cys-Gly-His-Cys) identique au site actif potentiel d'une protéine de la famille des protéines disulfides isomérases (PDI).
- 5 2. Protéine de *Leishmania* impliquée dans la virulence du parasite, comportant au moins un site (Cys-Gly-His-Cys) identique au site actif potentiel d'une protéine de la famille des protéines disulfides isomérases (PDI).
- 10 3. Protéine selon les revendications 1 ou 2, caractérisée en ce qu'il s'agit de la protéine LmPDI de *Leishmania major*, de séquence SEQ ID No: 2, ou d'un variant fonctionnel de la LmPDI, présentant au moins 40%, et de préférence au moins 80% d'identité avec la LmPDI.
- 15 4. Polypeptide recombinant comportant au moins un fragment de plus de 10 acides aminés d'une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, ledit polypeptide recombinant étant susceptible de déclencher une réaction immunologique contre un épitope de la LmPDI, lorsqu'il est administré à un hôte, humain ou animal.
- 5 5. Polypeptide recombinant selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il s'agit de la protéine LmPDI-(His)₆ de séquence SEQ ID No : 3.
- 20 6. Protéine de fusion comportant un polypeptide recombinant selon la revendication 4, fusionné à un autre fragment polypeptidique, ladite protéine de fusion étant susceptible de déclencher une réaction immunologique contre un épitope de la LmPDI, lorsqu'elle est administrée à un hôte, humain ou animal.
- 25 7. Séquence d'acide nucléique recombinant codant pour une protéine ou un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

8. Séquence d'acide nucléique selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence codante correspondant aux nucléotides 241 à 1674 de la séquence SEQ ID No : 1, ou un fragment de cette séquence de taille supérieure ou égale à 100 nucléotides.
- 5 9. Vecteur d'acide nucléique, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'acide nucléique selon la revendication 7 ou 8.
10. Vecteur selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un plasmide, d'un cosmide, d'un phage, ou d'un virus.
- 10 11. Cellule en culture comprenant un vecteur selon la revendication 9 ou 10.
12. Cellule selon la revendication 11, caractérisée en ce qu'il s'agit de la souche bactérienne LmPDI-XL₁, déposée à la Collection Nationale de Culture des Microorganismes (CNCM) le 31/01/2001 sous le numéro I-2621.
- 15 13. Utilisation d'une sonde d'acide nucléique s'hybridant spécifiquement, en conditions de forte stringence, avec la séquence nucléique de SEQ ID No : 2, pour déterminer la présence ou l'absence du gène de virulence codant pour la LmPDI, dans un échantillon biologique.
- 20 14. Amorce nucléotidique caractérisée en ce qu'elle permet l'amplification spécifique d'au moins une partie de la séquence de SEQ ID No : 1, à partir de cellules infectées par *Leishmania*, permettant ainsi de déterminer la présence ou l'absence du gène de virulence codant la LmPDI, dans un échantillon biologique.
15. Anticorps purifié, reconnaissant spécifiquement la LmPDI.
- 25 16. Composition immunogène, comportant une protéine selon la revendication 1, 2, 3 ou 6 et/ou un polypeptide recombinant selon la

rev ndication 4 ou 5, et/ou une séquence d'acide nucléique selon la revendication 7 ou 8, et/ou un vecteur selon la rev ndication 9 ou 10, et/ou une cellule selon la revendication 11, ladite composition immunogène étant capable de stimuler *in vitro* la prolifération de cellules mononucléées provenant d'individus ayant été en contact avec un parasite *Leishmania*.

17. Composition immunogène selon la revendication 16, capable de stimuler *in vitro* la prolifération de cellules mononucléées provenant d'individus ayant été en contact avec *Leishmania major*.

18. Composition immunogène selon la revendication 16 ou 17, de formulation pharmaceutiquement acceptable pour être administrée à un hôte humain ou animal.

19. Composition immunogène selon les revendications 16 à 18, capable d'induire une réponse immunitaire de type Th1 lorsqu'elle est administrée à un hôte, humain ou animal.

20. Composition vaccinante comportant une protéine selon la revendication 1, 2, 3 ou 6, et/ou un polypeptide recombinant selon la revendication 4 ou 5, et/ou une séquence d'acide nucléique selon la revendication 7 ou 8, et/ou un vecteur selon la revendication 9 ou 10, et/ou une cellule selon la revendication 11, ladite composition vaccinante étant destinée à protéger un hôte, humain ou animal, contre la leishmaniose.

21. Composition vaccinante selon la revendication 20, de formulation pharmaceutiquement acceptable pour être administrée à une hôte humain ou animal.

22. Composition immunogène et/ou vaccinante selon l'une quelconque d s revendications 16 à 21, comportant en outre un antigène étranger à

Leishmania et/ou une séquence d'acide nucléique codant pour un antigène étranger à *Leishmania*.

23. Procédé de criblage de molécules susceptibles d'inhiber la croissance de *Leishmania major*, comportant une étape d'évaluation de la capacité desdites molécules à inhiber l'activité de la LmPDI.

24. Procédé de criblage selon la revendication 23, dans lequel l'étape d'évaluation de la capacité d'une molécule à inhiber l'activité de la LmPDI est effectuée dans un test de réactivation de la RNase A réduite et dénaturée, comportant les étapes suivantes :

- incubation de la RNase A réduite et dénaturée en présence de LmPDI, dans des conditions permettant sa réactivation,
- incubation de la RNase A réduite et dénaturée dans des conditions identiques à celles permettant sa réactivation par la LmPDI, en ajoutant la molécule à tester,
- comparaison des résultats obtenus en absence et en présence de la molécule à tester, un défaut de réactivation de la RNase A en présence de la molécule testée révélant que cette molécule possède une activité inhibitrice de la LmPDI.

25. Procédé de criblage selon les revendications 23 et 24, comportant en outre un test d'inhibition de la croissance de *Leishmania major* en milieu liquide et, le cas échéant, un test d'inhibition de la croissance de *Leishmania major* dans un modèle murin de leishmaniose expérimentale.

26. Utilisation d'un ou plusieurs inhibiteurs des Protéines Disulfides Isomérases (PDI), pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à la prophylaxie, à l'atténuation, ou au traitement d'une infection par *Leishmania*.

27. Utilisation selon la revendication 26, dans laquelle un inhibiteur des PDI est un anticorps anti-PDI ou anti-LmPDI, la bacitracine, la bacitracine de zinc, l'acide 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoïque) (DTNB), l'acide p-chloromercuribenzenesulfonique (pCMBS), ou l'acide tocinoïque.

5 28. Utilisation selon la revendication 26 ou 27, pour la préparation d'une composition administrable à un hôte humain ou animal, par voie topique, orale ou parentérale.

10 29. Utilisation de la bacitracine ou de la bacitracine de zinc comme inhibiteur de la croissance d'un parasite responsable de la leishmaniose ou comme agent actif contre une infection à *Leishmania*.

30. Composition pharmaceutique destinée au traitement d'une infection par *Leishmania*, comportant un anticorps selon la revendication 15.

15 31. Composition selon la revendication 30, appropriée à une administration topique, orale ou parentérale.

32. Composition pharmaceutique destinée au traitement d'une infection par *Leishmania*, contenant un ou plusieurs inhibiteurs des Protéines Disulfides Isomérases (PDI).

20 33. Composition pharmaceutique selon la revendication 32, contenant de la bacitracine ou de la bacitracine de zinc.

34. Méthode de diagnostic *in vitro* d'une infection par un parasite responsable de la Leishmaniose, caractérisée en ce qu'elle comprend :

25 - la mise en contact d'au moins un anticorps selon la revendication 15 avec un prélèvement biologique d'un sujet partiellement infecté par un parasite responsable de la Leishmaniose, dans des conditions permettant la formation d'un complexe immun entre ledit

anticorps et les protéines antigéniques contenues dans le prélèvement,

- la détection dudit complexe.

35. Trousse de diagnostic pur la mise en œuvre de la méthode selon la revendication 34 caractérisée en ce qu'elle comprend :

- au moins un anticorps selon la revendication 15,
- un milieu approprié à la formation d'un complexe immun avec ledit anticorps,
- des réactifs permettant la détection des complexes éventuellement formés,
- le cas échéant, des échantillons témoins.